Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent

Livret du produit

Code : RPN2232
RPN2236



Table des matières

1. Mentions légales

GE imagination à l'oeuvre et GE monogram sont des marques déposées de General Electric Company.

Amersham, ECL, ECL DualVue, ECL Plex, Hybond, Hyperfilm, ImageQuant et Rainbow sont des marques déposées de GE Santé.

Amersham ECL Prime est fabriqué et vendu sous licence de Cyanagen Srl et fait l'objet des demandes de brevets américaines, canadiennes et de l'UE numéros US7803573; EP1962095; US7855287; EP1950207 US2012009603(A1); CA2742025; EP2405016, ainsi que d'autres brevets équivalents accordés et demandes de brevets dans d'autres pays.

Tween est une marque déposée de ICI Americas Inc.

Édition précédente septembre 2010

Tous les biens et services vendus sont sous réserve des modalités de vente de la société au sein de GE Santé qui les fournit.
Un exemplaire des présentes modalités est disponible sur demande. Contactez votre représentant GE Santé local pour obtenir les informations les plus récentes.

http://www.gelifesciences.com/ecl

GE Santé UK Limited.
Amersham Place, Little Chalfont,
Buckinghamshire, HP7 9NA UK

2. Description

Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent de GE offre une haute sensibilité pour la détection par chimioluminescence des antigènes spécifiques immobilisés conjugués aux anticorps marqués de peroxydase de raifort (HRP).

2.1 Introduction

La chimioluminescence est définie comme l'émission de lumière produite par une réaction à étapes multiples dans laquelle la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol. En présence des activateurs et des catalyseurs chimiques, l'intensité de la lumière et la durée de l'émission lumineuse sont considérablement accrues dans un processus connu sous le nom de chimioluminescence amplifiée (ECL). L'ECL fondées sur des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) est un procédé de détection sensible où l'émission de lumière est proportionnelle à la quantité de protéine. La réaction à étapes multiples est illustrée ci-dessous.

28-9829-42 AF 01-2014

2.2 Conception et caractéristiques

Le réactif de détection Amersham ECL Prime est conçu pour offrir une longue durée du signal (24 heures) et une sensibilité élevée (taux de l'ordre du picogramme). Le résultat lumineux de forte intensité signifie que des anticorps fortement dilués peuvent être utilisés, ce qui permet une détection optimale à l'aide d'une caméra CCD (par exemple, les systèmes ImageQuant™ LAS de GE). Il peut également être détecté en utilisant un film d'autoradiographie (par exemple, la gamme de produits Amersham Hyperfilm™).

2.3 Compatibilité de la membrane

Le réactif de détection Amersham ECL Prime est optimisé pour une utilisation avec la membrane de PVDF Amersham Hybond™ où le rendement par rapport à des substrats chimiluminescents standards est très rehaussé, mais il est également compatible avec la membrane de nitrocellulose Amersham Protran.

3. Informations importantes pour l'utilisateur

3.1 Utilisation prévue

Le réactif de détection Amersham ECL Prime est destiné à la détection par chimioluminescence dans le transfert Western blotting. Il est réservé uniquement à des fins de recherche et ne doit pas être utilisé dans des procédures cliniques ou à des fins de diagnostic.

3.2 Consignes de sécurité

Le présent manuel d'utilisation contient des MISES EN GARDE concernant l'utilisation sécuritaire du réactif de détection Amersham ECL Prime. Voir les définitions ci-dessous.

Mises en garde



MISE EN GARDE

MISE EN GARDE indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait provoquer des blessures mineures ou modérées. Il est important de ne rien entreprendre tant que toutes les conditions indiquées ne sont pas remplies et clairement comprises.

3.3 Contrôle de la qualité

Le réactif de détection Amersham ECL Prime est fabriqué conformément à notre système de gestion de la qualité certifié ISO 9001, et est en conformité avec les critères d'acceptation définis pour le produit.

4. Manipulation

4.1 Précautions de sécurité

Il est recommandé de lire la fiche signalétique (FS) avant d'utiliser le réactif de détection Amersham ECL Prime.



MISE EN GARDE

Substances dangereuses. Lors de l'utilisation de produits chimiques dangereux, prendre toutes les mesures de protection appropriées comme le port de lunettes de protection et de gants résistant aux substances utilisées. Respecter les réglementations locales et/ou nationales pour une exploitation sûre.

4.2 Stockage

À la réception, tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C. Le réactif de détection Amersham ECL Prime est sensible à l'exposition prolongée à la lumière. Toujours conserver les réactifs individuels dans les récipients étanches à la lumière dans lesquels ils sont fournis.

4.3 Expiration

Les composants sont stables pendant au moins trois (3) mois lorsqu'ils sont conservés dans les conditions recommandées. Voir la date d'expiration sur l'emballage.

5. Composants nécessaires

5.1 Composants de la trousse

Les composants suivants sont inclus dans la trousse du réactif de détection Amersham ECL Prime.

RPN2232
Solution A : solution de luminol, 50 ml

Solution B : solution de peroxyde, 50 ml

Suffisante pour 1 000 cm^2 de membrane

RPN2236
Solution A : solution de luminol, 3 x 50 ml

Solution B : solution de peroxyde, 3 x 50 ml

Suffisante pour 3 000 cm^2 de membrane

5.2 Solutions

Les solutions obligatoires sont indiquées ci-dessous.

- **Solution saline tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,5**
- **Solution saline tris-tamponnée (TBS), pH 7,6**
- **Tampon de dilution et de lavage : PBS Tween™ (PBS-T) et TBS Tween (TBS-T)**.

Une concentration de Tween 20 de 0,1 % est appropriée pour la plupart des applications de transfert.

5.3 Membrane

Utiliser un protocole approprié pour séparer les protéines par électrophorèse et les transférer sur une membrane de PVDF ou de nitrocellulose.

5.4 Réactifs de blocage

Les réactifs de blocage sont typiquement dilués entre 2 % et 5 % (v/v) dans du tampon PBS-T ou du tampon TBS-T. Les réactifs de blocage suivants sont recommandés :

- Agent de blocage Amersham ECL Prime
- Agent de blocage Amersham ECL
- Lait sec dégraissé
- Albumine de sérum bovin (BSA)

5.5 Réactifs d'immunodétection

- Un anticorps primaire spécifique à la ou aux protéines cibles
- Un anticorps secondaire conjugué à la HRP spécifique à l'anticorps primaire. *Voir Amersham ECL HRP-linked secondary antibodies, à la page 29*.

Diluer les anticorps dans du PBS-T ou TBS-T selon les recommandations *dans Plages de dilution, à la page 16.*

6. Optimisation Western blotting

6.1 Introduction

Pour obtenir un résultat optimal de Western blotting avec un rapport signal-bruit élevé et la meilleure sensibilité et linéarité possible, il est important d'optimiser le procédé et de sélectionner les produits compatibles.

Considérez ce qui suit :

- **La qualité de l'échantillon et la quantité de chargement** - Il est important que l'échantillon soit de bonne qualité et que des niveaux détectables de protéine cible soient présents.
- **Membrane et blocage** - Sélectionnez les membranes et les agents de blocage compatibles avec l'échantillon et les anticorps.
- **Anticorps primaires et secondaires** - Choisissez toujours des anticorps spécifiques de haute qualité et optimisez la dilution d'anticorps.
- **Détection et imagerie** - Sélectionnez le réactif de détection selon votre besoin d'application. Un capteur CCD offre une haute sensibilité et une large gamme dynamique et assure une meilleure quantification que le film radiographique.

Ce chapitre décrit les produits recommandés pour une utilisation avec le réactif de détection Amersham ECL Prime.

6.2 Marqueurs de poids moléculaire

Des marqueurs de poids moléculaire sont utilisés pour déterminer la taille de la protéine. En outre, des marqueurs précolorés permettent la confirmation du transfert et l'orientation des protéines (étant donné que les bandes colorées sont transférées à la membrane).

- **Les marqueurs Amersham Rainbow™** sont des marqueurs multicolores précolorés pour surveiller la progression de l'électrophorèse des protéines,

confirmant l'efficacité du transfert et la détermination du poids moléculaire des protéines transférées.

- **Les marqueurs Amersham ECL DualVue™** sont des marqueurs optimisés pour une utilisation avec Amersham ECL, Amersham ECL Prime et Amersham ECL Select et contiennent une combinaison de marqueurs de protéines précolorés et marqués. Ces marqueurs permettent la surveillance de l'électrophorèse, ce qui confirme l'efficacité du transfert et la détermination du poids moléculaire des protéines transférées sans coloration sur du gel et la membrane, ainsi que dans la détection en chimioluminescence.

6.3 Membranes

- **Les membranes Amersham Hybond** sont de PVDF avec une grande capacité de liaison de la protéine et une forte résistance mécanique, ce qui les rend idéales pour les applications de Western blotting où le décapage et le resondage sont nécessaires. La membrane est optimale pour une utilisation avec les réactifs de détection Amersham ECL Prime et Amersham ECL Select.
- **Les membranes Amersham Protran** sont de nitrocellulose compatibles avec tous les substrats de Western blotting chimiluminescents. Le principal avantage est le faible bruit de fond habituel.

6.4 Transfert

- **Le transfert humide** est la méthode de transfert la plus couramment utilisée. Il assure un transfert efficace des petites aux grandes protéines.
- **Le transfert semi-sec** est plus rapide que le transfert humide et consomme moins de tampon. Le transfert semi-sec fonctionne bien pour la plupart des protéines, mais le transfert peut être moins efficace pour les grosses protéines. Il a pu réduire la sensibilité des protéines très peu abondantes.

6.5 Blocage

Après le transfert des protéines, la membrane doit être mise en incubation dans une solution de blocage pour empêcher la liaison non spécifique des anticorps, ce qui peut provoquer du bruit de fond et des bandes de protéine non spécifiques sur le transfert. L'agent de blocage doit être optimisé pour obtenir les meilleurs résultats, mais il n'y a aucun agent de blocage unique et optimal pour l'ensemble des protéines et anticorps. GE Santé recommande les agents de blocage suivants, compatibles avec Amersham ECL, Amersham ECL Prime et Amersham ECL Select :

- **Agent de blocage Amersham ECL Prime**
- **Agent de blocage Amersham ECL**
- **Agent de blocage BSA**
- **Lait sec dégraissé**

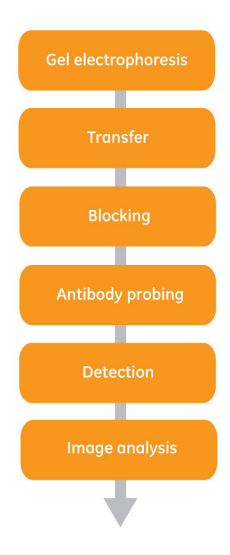
6.6 Manuel Western blotting

Davantage d'aide technique, de conseils et de bonnes pratiques sont disponibles dans le manuel Western Blotting Principles and Methods de GE Santé (n° de code 28-9998-97).

7. Protocole

7.1 Aperçu du protocole

Voici un aperçu du protocole de détection du Western blotting.



7.2 Électrophorèse et transfert

Étape	Action
1.	Effectuer l'électrophorèse et transférer les protéines sur une membrane appropriée selon les protocoles standards. Les transferts sont de préférence utilisés immédiatement mais peuvent être stockés dans du PBS-T ou TBS-T entre 2 °C et 8 °C. ***Remarque :*** *Les membranes de Amersham Hybond PVDF doivent être prémouillées dans 100 % de méthanol avant l'équilibrage dans un tampon de transfert*.

7.3 Blocage

Étape	Action
1.	Incuber la membrane dans une solution de blocage appropriée dans un agitateur orbital pendant 1 heure à température ambiante ou pendant une nuit entre 2 °C et 8 °C.
2.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage. ***Remarque :*** *Pour la préparation du tampon de lavage, voir Solutions, à la page 9.*

7.4 Sondage des anticorps

En raison de la sensibilité accrue du réactif de détection Amersham ECL Prime, l'optimisation des concentrations en anticorps est recommandée afin d'assurer les meilleurs résultats. La dilution optimale varie en fonction de l'affinité et de la qualité des anticorps. L'optimisation de la dilution des anticorps peut être effectuée par analyse dot-blot (*voir Détermination de la concentration optimale en anticorps, à la page 22*).

Plages de dilution

Les plages de dilution suivantes sont recommandées :

Anticorps	Plage de dilution à partir de 1 mg/ml de solution de stockage
Primaires	1:1000 - 1:30 000
Secondaires	1:50 000 - 1:200 000

Le tableau ci-dessous montre les dilutions initiales suggérées des anticorps primaires avec différents niveaux d'affinité.

Type d'anticorps	Dilution des anticorps primaires	Dilution des anticorps secondaires
Anticorps primairesà haute affinité	1:5000	1:50 000
Anticorps primaires à affinité moyenne à basse	1:3000	1:30 000

Incubation de l'anticorps primaire

Étape	Action
1.	Diluer l'anticorps primaire dans du PBS-T ou TBS-T.
2.	Incuber la membrane dans la solution d'anticorps primaire sur un agitateur orbital pendant une (1) heure à température ambiante ou pendant une nuit entre 2 °C et 8 °C.
3.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage.
4.	Laver la membrane 4 à 6 fois dans du tampon de lavage pendant 5 minutes à chaque fois à température ambiante sur un agitateur orbital. ***Remarque :*** *L'exposition à un film radiographique nécessite 6 étapes de lavage, afin d'éviter le bruit de fond.*

Incubation de l'anticorps secondaire

Étape	Action	Remarques
1.	Diluer l'anticorps secondaire (anticorps conjugué à la HRP ou biotinylé) dans du PBS-T ou TBS-T.	Augmenter la production de lumière en construisant un sandwich à trois couches au moyen d'anticorps secondaires biotinylés et de streptavidine conjuguée à la HRP.
2.	Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur orbital.	
3.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage.	
4.	Laver la membrane 4 à 6 fois dans du tampon de lavage pendant 5 minutes à chaque fois à température ambiante sur un agitateur orbital.	L'exposition à un film nécessite 6 étapes de lavage, afin d'éviter le bruit de fond.

Si vous utilisez un anticorps secondaire conjugué à la HRP, passez directement à *Détection*, à la page 18.

Si vous utilisez un anticorps biotinylé, procédez avec le protocole d'incubation de passerelle de la streptavidine qui suit.

Incubation de passerelle de la streptavidine

Étape	Action
1.	Diluer le conjugué HRP de streptavidine ou le complexe HRP biotinylé de streptavidine dans une solution saline tampon phosphate Tween (PBS-T) ou tris-tamponnée Tween (TBS-T).
2.	Incuber la membrane dans la solution diluée pendant une (1) heure à température ambiante sur un agitateur orbital.
3.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage.
4.	Laver la membrane par mise en suspension dans du tampon de lavage en quantité suffisante pour recouvrir la membrane et agiter pendant 5 minutes à température ambiante. Remplacer le tampon de lavage au moins 4 à 6 fois.

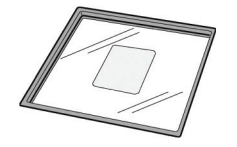
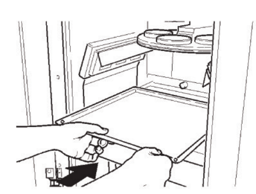
7.5 Détection

Étape	Action
1.	Laisser les solutions de détection atteindre la température ambiante pendant 20 minutes.
2.	Mélanger les solutions de détection A (luminol) et B (peroxyde) dans un rapport de 1:1 à une solution de travail. Le volume final du réactif de détection exigé est 0,1 ml/cm^2 de membrane. ***Remarque :*** *Si le réactif mélangé n'est pas utilisé immédiatement, le protéger de la lumière.*
3.	Égoutter le tampon de lavage en excès de la membrane lavée et le placer avec le côté protéine vers le haut dans un récipient approprié ou sur une feuille de pellicule plastique ou une autre surface propre appropriée. Ajouter du réactif de détection sur la membrane et s'assurer qu'il la recouvre complètement.
4.	Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
5.	Égoutter le réactif de détection en excès en tenant délicatement le bord de la membrane contre une serviette.

7.6 Analyse des images

Deux protocoles d'analyse des images sont décrits, l'un pour la formation d'images à partir de la caméra CCD et l'autre utilisant le film radiographique.

Caméra CCD

Étape	Action	Remarques
1.	Placer le transfert, côté protéine vers le haut, sur un plateau d'échantillons. 	Le transfert peut être placé sur un morceau de pellicule plastique, côté protéines vers le haut, pour faciliter le déplacement du film sur le plateau d'échantillons.
2.	Placer le plateau d'échantillons dans le compartiment de la caméra CCD et sélectionner la durée d'exposition et/ou la fonction appropriées. 	Utilisez la fonction d'exposition automatique ou sélectionnez la durée d'exposition manuellement. La durée d'exposition initiale recommandée est de 60 secondes. Augmentez ou diminuez la durée d'exposition en fonction de l'intensité du signal obtenu.

Film radiographique

Étape	Action	Remarques
1.	Placer le transfert, côté protéine vers le bas, sur un nouveau morceau de pellicule plastique, envelopper les transferts et lisser délicatement pour retirer les bulles d'air.	
2.	Placer le transfert enroulé avec le côté protéine vers le haut dans une cassette de film radiographique.	Assurez-vous qu'il n'y a pas de réactif de détection libre dans la cassette; le film ne doit pas être mouillé.
3.	Placer le film radiographique (gamme de produits Amersham Hyperfilm) sur le dessus de la membrane. Fermer la cassette et activer l'exposition. La durée d'exposition initiale adéquate est de 1 minute.	Cette étape doit être effectuée dans une chambre noire en utilisant des lumières rouges sûres. Ne déplacez pas le film pendant qu'il est exposé.
4.	Développer le film immédiatement et, selon l'intensité du signal obtenu, estimer la durée d'exposition pour le deuxième film.	

8. Informations supplémentaires

8.1 Décapage et resondage des membranes

L'élimination complète des anticorps primaires et secondaires à partir de la membrane est possible en suivant le protocole décrit ci-dessous. Les membranes peuvent être décapées et resondées plusieurs fois.

Étape	Action	Remarques
1.	Placer la membrane dans du tampon de décapage (100 mM de 2-mercaptoéthanol, 2 % de SDS, 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,7) et incuber à 50 °C pendant 30 minutes avec agitation occasionnelle.	Si des conditions plus strictes sont exigées, l'incubation peut être réalisée à 70 °C ou pendant une durée plus longue.
2.	Laver la membrane pendant 3 × 10 minutes dans du PBS-T ou TBS-T à température ambiante en utilisant de grands volumes de tampon de lavage. La membrane peut être utilisée immédiatement ou conservée dans du PBS-T ou TBS-T entre 2 et 8 °C.	Les membranes peuvent être incubées avec réactif de détection Amersham ECL Prime et exposées à un film ou imagées par la caméra CCD pour assurer l'élimination des anticorps.
3.	Bloquer la membrane dans une solution de blocage appropriée pendant 1 heure à température ambiante.	
4.	Répéter le protocole d'immunodétection au Chapitre 7, de 7.4 Sondage des anticorps à 7.6 Analyse des images.	

8.2 Détermination de la concentration optimale en anticorps

En raison de la haute sensibilité du réactif de détection Amersham ECL Prime, l'optimisation des concentrations en anticorps est recommandée afin d'assurer les meilleurs résultats. En général, des concentrations plus faibles d'anticorps primaires et secondaires sont nécessaires avec le réactif de détection Amersham ECL Prime par rapport à des substrats chimiluminescents standards. Des protocoles permettant de déterminer les concentrations optimales en anticorps sont décrits ci-dessous.

Plages de dilution

Les plages de dilution suivantes sont recommandées :

Anticorps	Plage de dilution à partir de 1 mg/ml de solution de stockage
Primaires	1:1000 - 1:30 000
Secondaires	1:50 000 - 1:200 000

Optimisation de l'anticorps primaire

La méthode de transfert de tâche ou « dot-blot » est rapide et efficace pour déterminer la dilution optimale d'un anticorps primaire. En variante, un transfert Western peut être préparé puis découpé en plusieurs bandes. Il convient de noter que certains des anticorps peuvent nécessiter des étapes de blocage et de lavage alternatives à celles proposées comme suit.

Étape	Action
1.	Déposer des quantités différentes de l'échantillon de protéine, de préférence une série de dilutions, sur une membrane de PVDF ou de nitrocellulose et laisser sécher à l'air. Sinon, utiliser un dot-blot ou un collecteur slot-blot. Créer une série d'échantillons pour chaque dilution à tester. ***Remarque :*** *Les membranes de PVDF doivent être prémouillées dans du méthanol.*

Étape	Action
2.	Incuber dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
3.	Rincer les membranes brièvement avec deux changements de tampon de lavage.
4.	Couper la membrane pour mettre chaque série d'échantillons sur une bande de membrane distincte.
5.	Préparer différentes solutions d'anticorps primaire dans la plage d'anticorps recommandée. Incuber chaque bande de membrane dans une solution d'anticorps pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
6.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage. Laver la membrane par mise en suspension dans du tampon de lavage et agiter pendant 5 minutes à température ambiante. Remplacer le tampon de lavage au moins 4 à 6 fois.
7.	Diluer l'anticorps secondaire (en utilisant une seule concentration) et incuber les membranes pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
8.	Rincer les transferts dans deux changements de tampon de lavage, puis laver 4 à 6 fois dans de nouveaux changements de tampon de lavage.
9.	Détecter à l'aide du réactif de détection Amersham ECL Prime décrit dans *Détection, à la page 18* du protocole. La dilution d'anticorps qui donne le meilleur signal au bruit de fond minimal doit être sélectionnée.

Optimisation de l'anticorps secondaire

Étape	Action
1.	Déposer des quantités différentes de l'échantillon de protéine, de préférence une série de dilutions, sur une membrane de PVDF ou de nitrocellulose et laisser sécher à l'air. Sinon, utiliser un dot-blot ou un collecteur slot-blot. Créer une série d'échantillons pour chaque dilution à tester. ***Remarque :*** *Les membranes de PVDF doivent être prémouillées dans du méthanol.*
2.	Incuber dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
3.	Incuber dans un anticorps primaire dilué (concentration optimisée) pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
4.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage. Laver la membrane par mise en suspension dans du tampon de lavage et agiter pendant 5 minutes à température ambiante. Remplacer le tampon de lavage au moins 4 à 6 fois.
5.	Couper la membrane pour mettre chaque série d'échantillons sur une bande de membrane distincte.
6.	Préparer des solutions d'anticorps secondaire différentes dans la plage d'anticorps recommandée. Incuber chaque bande de membrane dans une solution d'anticorps pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
7.	Rincer brièvement la membrane avec deux changements de tampon de lavage. Laver la membrane par mise en suspension dans du tampon de lavage et agiter pendant 5 minutes à température ambiante. Remplacer le tampon de lavage au moins 4 à 6 fois.
8.	Détecter à l'aide du réactif de détection Amersham ECL Prime décrit dans *Détection, à la page 18* du protocole. La dilution d'anticorps qui donne le meilleur signal au bruit de fond minimal doit être sélectionnée.

9. Guide de dépannage

Problèmes	Causes/recours possibles
Pas de signal	• Quantités non détectables de protéine cible. • L'anticorps primaire n'est pas lié à la protéine cible, ce qui peut être dû à une mauvaise qualité et/ou un anticorps primaire non spécifique. • Une espèce incorrecte d'anticorps secondaire a été utilisée. • Membrane de PVDF non prémouillée dans du méthanol. • Vérifiez que l'équipement de transfert fonctionne correctement et que la procédure correcte a été suivie. • Vérifiez le transfert de la protéine par coloration de la membrane et/ou du gel. • Confirmez l'efficacité du transfert en utilisant le Rainbow marker précoloré. • Certaines protéines peuvent être affectées par les traitements requis pour l'électrophorèse. • Les réactifs de détection ne fonctionnent pas correctement. - Pour tester l'activité du réactif de détection, préparez 1 à 2 ml de solution de travail de réactif de détection dans un tube à essai transparent dans une chambre noire. Ajoutez 1 µl de solution d'anticorps conjuguée à la HRP non diluée. La solution doit immédiatement émettre une lumière bleue visible qui s'estompe au cours des prochaines minutes. • Un stockage incorrect du réactif de détection Amersham ECL Prime peut provoquer une perte de signal. La croissance de bactéries inhibe le réactif.

Problèmes	Causes/recours possibles
Signal faible	• L'efficacité du transfert peut avoir été médiocre. • Une quantité insuffisante de protéine a été chargée sur le gel. • La concentration en anticorps primaires et secondaires pourrait être trop faible; l'optimisation est requise. • Mauvaise qualité et/ou anticorps primaire non spécifique. • La durée d'exposition peut avoir été trop courte.
Signal excessif, diffus ou évanoui-ssement rapide du signal	• Une quantité excessive de protéine a été chargée sur le gel. • Les concentrations en anticorps primaires et secondaires pourraient être trop élevées; l'optimisation est requise.
Bandes blanches (négatives) sur le film	• Les bandes négatives se produisent généralement lorsque la protéine cible est en excès et les concentrations en anticorps sont trop élevées. L'effet est provoqué par l'appauvrissement du substrat. - Chargez une quantité moindre de protéine. - Diluez encore les anticorps primaires et secondaires.
Bruit de fond non uniforme, tacheté	• Des zones du transfert peuvent avoir séché pendant une partie des incubations. • Une mauvaise manipulation peut entraîner une contamination des transferts et/ou des dommages à la membrane qui peuvent fournir un signal non spécifique. • L'agent de blocage n'a pas été complètement dissous dans le tampon. • Lavage insuffisant. - Ajoutez des étapes de lavage supplémentaires.

Problèmes	Causes/recours possibles
Bruits de fond élevés	• Des concentrations trop élevées en anticorps primaires et/ou secondaires; l'optimisation est requise. • Lavage insuffisant. - Utilisez une quantité suffisante de tampon de lavage et ajoutez des étapes de lavage supplémentaires. • Les tampons de transfert et d'incubation peuvent avoir été contaminés et doivent être remplacés. - Utilisez toujours des solutions fraîches • Blocage insuffisant. • L'agent de blocage utilisé n'a pas été fraîchement préparé, a été trop dilué ou était incompatible avec l'application. • Le niveau de Tween utilisé dans l'agent de blocage n'a pas été suffisant pour l'application exécutée. • La membrane a séché pendant une partie des incubations. • Mauvaise qualité du gel. • Mauvaise qualité des anticorps et anticorps non spécifiques. • La détection du signal par le film a fait l'objet d'une surexposition. • Le niveau du signal est si élevé que le film a été complètement surchargé. • Produits incompatibles.

10. Produits connexes

Ce chapitre présente un sous-ensemble de produits connexes. Pour plus d'informations, reportez-vous à www.gelifesciences.com

10.1 Équipements de transfert

Produit	Quantité	N° de code
Amersham Protran Supported 0.2 NC (20 × 20 cm)	25 feuilles	10600053
Amersham Protran Supported 0.2 NC (8 × 9 cm)	25 feuilles	10600099
Amersham Hybond LFP 0.2 PVDF (20 × 20 cm)	10 feuilles	10600060
Amersham Hybond LFP 0.2 PVDF (8 × 9 cm)	25 feuilles	10600102
Amersham Hybond 0.2 PVDF (20 × 20 cm)	25 feuilles	10600057
Amersham Hybond 0.2 PVDF (8 × 9 cm)	25 feuilles	10600101

10.2 Amersham ECL HRP-linked secondary antibodies

Produit	Quantité	N° de code
Amersham ECL Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab (from sheep)	1 ml	NA931-1ML
Amersham ECL Human IgG, HRP-Linked Whole Ab (from sheep)	1 ml	NA933-1ML
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab (from donkey)	1 ml	NA934-1ML
Amersham ECL Mouse IgG, HRP-Linked $F(ab)_2$ fragment (from sheep)	1 ml	NA9310-1ML
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-Linked $F(ab)_2$ fragment (from donkey)	1 ml	NA9340-1ML
Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate	100 µl	RPN1231-100UL

10.3 Réactifs de détection

Produit	Quantité	N° de code
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	pour 1 000 cm^2	RPN2232
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	pour 3 000 cm^2	RPN2236

GE Santé offices:

GE Santé Bio-Sciences AB
Björkgatan 30, 751 84
Uppsala
Sweden

GE Santé Europe GmbH
Munzinger Strasse 5 D-79111
Freiburg
Germany

GE Santé Bio-Sciences Corp.
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway,
NJ 08855-1327
USA

GE Santé Japan Corporation
Sanken Bldg. 3-25-1
Hyakunincho Shinjuku-ku
Tokyo 169-0073
Japan

Pour obtenir des informations sur les personnes à contacter en cas de besoin, consultez le site
www.gelifesciences.com/contact

GE Santé UK Limited
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire,
HP7 9NA, UK

http://www.gelifesciences.com



29-1362-48 AF 01-2014